INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG-GCBEv

LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE RETROTRANSPOSONS DO TIPO *REX* EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818*)* SUBMETIDOS AOS CENÁRIOS PROPOSTOS PELO PAINEL INTERGOVERNAMENTAL SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICAS - IPCC

ALEX MATHEUS VIANA FERREIRA

MANAUS, AMAZONAS

FEVEREIRO, 2019

ALEX MATHEUS VIANA FERREIRA

LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE RETROTRANSPOSONS DO TIPO *REX* EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818*)* SUBMETIDOS AOS CENÁRIOS PROPOSTOS PELO PAINEL INTERGOVERNAMENTAL SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICAS - IPCC

ORIENTADORA: ELIANA FELDBERG, DRA. - INPA

Coorientadora: Leila Braga Ribeiro, Dra. – UFRR

Financiamento

INCT/CNPq/FAPEAM (fase II) - Centro de Estudos de Adaptações da Biota Aquática da Amazônia – ADAPTA II

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS, AMAZONAS

FEVEREIRO, 2019

Ficha Catalográfica

F383l Ferreira, Alex Matheus Viana

LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE RETROTRANSPOSONS DO TIPO REX EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818) SUBMETIDOS AOS CENÁRIOS PROPOSTOS PELO PAINEL INTERGOVERNAMENTAL SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICAS - IPCC / Alex Matheus Viana Ferreira; orientadora Eliana Feldberg; coorientadora Leila Braga Ribeiro. -- Manaus:[s.l], 2019.

42 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) -- Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2019.

1. Mudanças climáticas. 2. Heterocromatinização. 3. Elementos transponíveis. 4. FISH. I. Feldberg, Eliana , orient. II. Ribeiro, Leila Braga, coorient. III. Título.

CDD: 597.80415

Sinopse: São apresentados dados citogenéticos a respeito do comportamento de elementos transponíveis do tipo *Rex* em exemplares de *Colossoma macropomum*, submetidos aos cenários propostos pelo Painel Intergovernamental sobre mudanças Climáticas (IPCC). Foram utilizados como marcadores os retroelementos *Rex1*, *Rex3* e *Rex6* e regiões de heterocromatina constitutiva, para inferir sobre os impactos que estas mudanças ambientais podem causar no genoma da espécie. A partir dos dados obtidos verificamos que as condições testadas causaram mudanças no comportamento dessas sequências. Ainda, verificamos um processo de heterocromatinização no genoma dos indivíduos submetidos ao cenário extremo. Assim, sugerimos que este processo epigenético está relacionado à atividade de transposição de elementos transponíveis.

Palavras-chave: Mudanças climáticas, Heterocromatinização, Elementos transponíveis, FISH.

Ata de defesa Pública

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO PPG GCBEv GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA — INPA INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA — Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação — PÁTRIA AMADA BRASIL GOVERNO FEDERAL

ATA DA DEFESA PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA

No dia 15 de Março de 2019, às 14:30 horas, na Sala de Aulas do PPG GCBEV, Campus II- INPA-Aleixo, reuniu-se a Banca Julgadora da **DEFESA PÚBLICA de MESTRADO**, composta pelas seguintes Doutoras, membros titulares: Josiane Baccarin Traldi, Milena Ferreira dos Santos e Carolina Sousa de Sá Leitão; tendo como membros suplentes: Vera Maria Fonseca de Almeida e Val e Gislene Almeida Carvalho-Zilse, afim de proceder a arguição pública da **DISSERTAÇÃO** do estudante **ALEX MATHEUS VIANA FERREIRA**, intitulada: **"LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE RETROTRANSPOSONS DO TIPO *REX* EM TAMBAQUI (*Colossoma macropomum)* SUBMETIDOS AOS CENÁRIOS PROPOSTOS PELO PAINEL INTERGOVERNAMENTATAL SOBRE MUDANÇAS CLIMÁTICAS – IPCC".** O estudo foi conduzido sob a orientação da Dra. Eliana Feldberg, do INPA.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

☐ Aprovado por maioria ☐ Reprovado
☒ Aprovado por unanimidade

Menção:
☐ Aprovado com "Distinção" ☐ Aprovado com "Distinção e Louvor"

Foi lavrada a ata e assinada pelos Doutores(as), membros presentes da Banca Julgadora.

Josiane Baccarin Traldi - UFAM _____
Milena Ferreira dos Santos – UNINORTE _____
Carolina Sousa de Sá Leitão - INPA _____
Vera Ma. Fonseca de Almeida e Val – INPA _____
Gislene Almeida Carvalho-Zilse – INPA _____

Dra. Jacqueline da Silva Batista
Coordenadora do PPG GCBEv/INPA
PO. 281/2017 – INPA/MCTIC-PR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INPA GCBEv

Esta Ata não tem efeito de conclusão de curso ou diplomação do estudante. Conforme Regulamento PPG GCBEv Art. 62 "Será conferido ao discente o título de MESTRE ou DOUTOR em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, desde que cumpridas às exigências das Agências de Fomento, dos regulamentos do PPG-INPA e do PPG GCBEv. Para obtenção do titulo, o estudante deve cumprir, ainda, o exigido nos Arts. 52 ao 55 do Regulamento Geral do INPA e Arts. 61 e 64 do Regulamento PPG GCBEv.

Programas de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – PPG INPA
Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva – PPG GCBEv
Avenida André Araújo, 2936 – Bairro: Aleixo – Caixa Postal: 478 - CEP: 69.060-001 – Manaus/AM – Fone/Fax: (0xx92) 3643-3344
E-mail: gcbev@inpa.gov.br gcbeve@gmail.com http://gcbev.inpa.gov.br/

Agradecimentos

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por ter dado suporte para o desenvolvimento do presente trabalho.

À coordenação do programa de pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, na pessoa da Drª. Jacqueline da Silva Batista e Drª. Eliana Feldberg (Coordenadoras do programa), Elci Batista (secretária do curso), corpo docente, e colegas de curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo financiamento do projeto, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos Laboratórios de Ecofisiologia e Evolução Molecular e Temático de Biologia Molecular do INPA por terem cedido a estrutura para a realização de parte do trabalho.

Ás minhas orientadoras Drª. Eliana Feldberg e Drª. Leila Braga Ribeiro, que desde sempre me receberam de braços abertos no laboratório, auxiliando e orientando com dedicação, paciência e competência. Sem dúvida, fizeram toda diferença neste trabalho e na minha formação profissional.

Ao Laboratório de Genética Animal do INPA, onde desenvolvi este trabalho e aos amigos: Leonardo Goll, Leandro Marajó, Francijara Araújo, Vanessa Pinheiro, Ramon Favarato, Alber Campos, Erika Guimarães, José Sousa e Arlindo Batista que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Agradeço também à Simone Soares por ter me ajudado durante a realização das atividades no laboratório.

Um agradecimento especial aos amigos Thiago Gomes, Janice Quadros e Patrik Viana. Obrigado por sempre ouvirem minhas lamentações, quando algo dava errado, por toda ajuda e por sempre acreditarem em mim. Sem vocês eu não teria conseguido concluir este trabalho, amo vocês.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e sempre me incentivaram a continuar e alcançar meus objetivos, esta conquista também é de vocês. Agradeço por sempre terem acreditado em mim, mesmo quando eu mesmo não conseguia.

Resumo

A atividade dos Elementos transponíveis (ET) pode ser estimulada por diferentes tipos de estresses como choques térmicos ou mecânicos, ação de patógenos, poluição ambiental, mudanças ambientais, assim como mudanças climáticas. Em peixes, dentre os retrotransposons estudados, os do tipo *Rex* mostram-se como os mais abundantes, sendo encontrados em diferentes grupos e apresentando dinâmica de localização variada. A fim de entender os impactos que mudanças climáticas podem ter sob o genoma de peixes amazônicos, analisamos o comportamento dos ETs do tipo *Rex*, frente aos cenários previstos pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), tendo como modelo o tambaqui (*Colossoma macropomum*). Para isso, 60 tambaquis juvenis foram separados em 4 grupos, cada um com 15 indivíduos, e cada grupo foi colocado em uma sala no microcosmos, onde na sala 1 eram simuladas as condições climáticas que temos hoje em dia, a sala 2 simulava as condições descritas para o cenário B1, a sala 3 simulava o cenário A1B, e a sala 4 simulava o cenário A2, conforme descrito pelo IPCC. Após 45 dias de experimento, os indivíduos foram eutanasiados e tiveram seu rim retirado e processado para análises citogenéticas, relacionadas à detecção das regiões de heterocromatina constitutiva e mapeamento das sequências *Rex* por FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*). Foi verificada uma heterocromatinização no genoma dos indivíduos submetidos ao cenário A2, que apresentaram blocos conspícuos em regiões teloméricas de diversos pares cromossômicos, assim como marcações intersticiais em alguns pares. Junto a isso, também houve um aumento no número de sítios dos ETs *Rex1* e *Rex3* no genoma dos indivíduos aclimatados ao cenário A2. O aumento da atividade dessas sequências pode estar relacionado à adaptação às mudanças ambientais, uma vez que a atividade de ETs pode gerar alterações na atividade de genes, regulando-os positivamente ou negativamente, ou ainda silenciando genes próximos ao local de inserção. Além disso, houve correspondência entre os blocos de *Rex3* e os blocos heterocromáticos nos peixes submetidos ao cenário A2. Dessa forma, a heterocromatinização nessas regiões ocorre como um mecanismo de regulação da atividade deste retroelemento.

Palavras-chave: Mudanças climáticas, Heterocromatinização, Elementos transponíveis, FISH, Microcosmo.

Abstract

The activity of transposable elements (TEs) can be increased by different sources as thermal or mechanic shocks, disease, environmental pollution and climate changes. In fishes, *Rex* retrotransposons are shown as the most abundance, they have been found in different fish groups and presented various dynamics. In order to understand the impacts of climate changes may have under amazon fish genome we analyzed the behavior of *Rex* TEs under the scenarios predicted by Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), using tambaqui (*Colossoma macropomum*) as a model. For this, 60 young tambaquis were separated in 4 groups with 15 individuals, and each group was maintained in a microcosm room, where in the room 1 were simulated the conditions that we have nowadays, the room 2 simulated the conditions described for B1 scenario, room 3 simulated A1B scenario, and the room 4 simulated A2 scenario, according to IPCC. After 45 days of experiment, the individuals were euthanized and had its kidney removed for cytogenetics analysis related to C-banding and mapping of *Rex* sequences by FISH. Was verified a heterochromatinization in the genome of all individuals maintained in the A2 scenario, they showed blocks in telomeric regions of many chromosomic pairs and they also have interstitial marks in some pairs. In addition, these individuals have an increase in number of *Rex1* and *Rex3* sites. The increase of the activity of these sequences may be related a local adaptation to the environmental changes, once the activity of TEs can generate alterations on the gene activity, upregulating or downregulating, or even silencing genes near by the insertion point. Moreover, there was correlation between *Rex3* blocks and heterochromatin in fishes under A2 scenario. Thus, the heterochromatinization in this region occur as a regulation mechanism of the activity of this retroelement.

Key words: Climate changes, Heterochromatinization, Transposable elements, FISH, microcosm.

Sumário

1.Introdução 1
1.1.Mudanças climáticas 1
1.2.Estudos citogenéticos 3
1.3.*Colossoma macropomum* 7
2.Objetivos 8
3.Material e métodos 9
3.1.Delineamento experimental 9
3.1.1. Cenários Climáticos em Microcosmo 9
3.1.2.Exposição aos cenários climáticos em microcosmo 9
3.2. Obtenção dos cromossomos metafásicos 10
3.3. Bandeamento C 10
3.4. Extração de DNA 11
3.5. Amplificação das sequências 11
3.6. Marcação de Sonda 12
3.7. Mapeamento cromossômico 12
4.Resultados 14
5.Discussão 19
6.Conclusões 24
Referências Bibliográficas 25

1. Introdução

1.1. Mudanças climáticas

As mudanças climáticas globais, decorrentes do acúmulo de Gases de Efeito Estufa (GEE) na atmosfera, dentre os quais destacam-se dióxido de carbono –CO_2, metano –CH_4, e os óxidos nitrosos –NO_x, representam um desafio sem precedentes para a humanidade tanto pela velocidade com que estão se processando, quanto por suas consequências à atividade humana (Nobre *et al.* 2007; IPCC 2014). As primeiras evidências de alterações no clima do planeta surgiram por volta dos anos 1980 e, desde então, essa temática vem tomando posição de destaque na comunidade científica e despertando interesse da população de modo geral (Marengo 2008).

Devido ao desconhecimento sobre os impactos de alterações na estabilidade climática mundial, em 1988 a Organização das Nações Unidas, por meio do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente e da Organização Meteorológica Mundial, criou o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (*Intergovernamental Panel on Climate Change* - IPCC). O IPCC ficou incumbido de apoiar, com trabalhos científicos, as avaliações do clima e os cenários de mudanças climáticas para o futuro. (Marengo 2008).

Os dados acerca das variações de temperatura do último século apresentados pelo IPCC, já indicam uma mudança considerável e rápida em várias partes do planeta e revelam que, de acordo com diversas instituições de pesquisa ao redor do mundo, há um aumento gradual na temperatura da Terra. O mesmo relatório alerta para um aumento da temperatura média da superfície global de 0,3 ºC a 4,8 ºC até o fim deste século, dados projetados a partir das observações feitas entre os anos de 1986 a 2005 (IPCC 2013). Também são esperadas temperaturas extremas, tanto de frio quanto de calor na maioria das áreas do planeta, podendo também haver um aumento de ondas de calor com duração prolongada em algumas localidades, assim como ondas de frio extremo em pontos do globo durante o inverno. Além disso, os dados apontam para um aumento na acidificação dos oceanos, o que configura uma ameaça à biodiversidade, interrupção no ciclo global e disponibilidade de água doce em diversas localidades, devido a alterações nos índices de precipitação, o que causaria mudanças ecológicas substanciais em escala global (IPCC 2013; O'Neill *et al.* 2017).

Altas emissões de GEE representam um grande risco, de forma generalizada, e podem trazer consequências irreversíveis até o fim deste século. Os riscos aos sistemas únicos e

ameaçados aumentam de forma mais rápida com o aumento de temperatura (O'Neill *et al.* 2017). O IPCC em seu 4.o relatório estimou que entre 20-30% das espécies estarão em alto risco de extinção se a temperatura do planeta aumentar entre 2-3 ºC. Além disso, com o aumento de 4 ºC estima-se que muitas espécies sofrerão mudanças na sua distribuição ao longo do globo, tornando-se restritas a determinadas regiões (Warren *et al.* 2014). Aves e anfíbios apresentam a maior vulnerabilidade a alterações na temperatura, sendo que entre as aves 6-9% poderiam sofrer extinção, e este número é ainda maior para os anfíbios (11-15%) (Foden *et al.* 2013).

Em vista dessas estimativas, cenários foram propostos, projetando essas mudanças climáticas até o ano 2100, levando em conta algumas das forças motrizes que dirigem tais alterações. O cenário **A1B** descreve um crescimento econômico rápido, com introduções de novas e eficientes tecnologias, além do crescimento rápido da população até o fim do século, seguida de um declínio. Descreve ainda, a utilização de combustíveis não fósseis, ou balanço entre o uso de combustíveis fósseis e não fósseis, sendo este cenário intermediário, com previsão de aumento na temperatura média de aproximadamente 2,5 ºC e aumento de 850ppm de CO_2. O cenário **B1** prevê um mundo convergente, onde a população cresce de maneira rápida até a metade do século e declina a partir daí, semelhante ao que é descrito no cenário **A1B**, no entanto, com rápidas mudanças econômicas e com introdução de tecnologias limpas e eficientes em termos de recursos. A ênfase é em soluções globais para a sustentabilidade econômica, social e ambiental, incluindo a equidade, mas sem iniciativas climáticas adicionais, sendo este cenário o mais otimista, com aumento médio da temperatura global de 1,5 ºC e aumento de 600ppm de CO_2 até o fim do século. As previsões mais agravantes são as descritas no cenário **A2**, onde o desenvolvimento tecnológico e a implementação de novas tecnologias é fragmentada, assim como o desenvolvimento econômico, que visa o desenvolvimento regional, e, segundo essas previsões, o desenvolvimento é mais lento que nos outros. Este é o cenário mais heterogêneo, onde visam a autossuficiência e preservação das identidades locais, o aumento médio na temperatura global de 4,5 ºC ou mais e aumento de 850ppm de CO_2 (IPCC 2007).

Nas últimas décadas, três modelos regionais integrados para a América do Sul apontam que o maior aquecimento ocorrerá na região amazônica, entre 4 ºC e 9 ºC para o cenário A2 e de 3 ºC a 5 ºC para o cenário B1, no período de 2071–2100 (Ambrizzi *et al.* 2007; Marengo *et al.* 2010). Adicionalmente, o aumento da temperatura junto à diminuição da precipitação pode gerar alterações na vegetação da região, levando a um processo de "savanização" (Nobre *et al.*

2008). Além disso, a queda nos níveis de precipitação, devido ao aumento nos níveis de CO_2, pode alterar todo o ciclo hidrológico da região, podendo gerar eventos extremos tanto de seca quanto de cheia (Nobre *et al.* 2007; Souza *et al.* 2016).

Diante do exposto, fica evidente que as mudanças climáticas podem gerar profundas alterações no ecossistema amazônico (Ambrizzi *et al.* 2007; O'Neill *et al.* 2017). Alterações que podem afetar as espécies de formas diferentes, a depender de quão especialistas elas são e de quais estratégias elas utilizam ao longo da evolução (Gilman *et al.* 2010). De modo geral, os peixes amazônicos desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, adaptações comportamentais, morfológicas e fisiológicas que os permitem enfrentar variações ambientais (Val e Almeida-Val 1995). Contudo, estudos citogenéticos que investiguem os impactos causados por mudanças climáticas no genoma de espécies amazônicas ainda são escassos.

1.2. Estudos citogenéticos

Dentre as sequências mais estudadas na avaliação de danos citogenéticos destacam-se as de DNA repetitivo. Acredita-se que o DNA repetitivo, por exemplo os elementos transponíveis, desempenha um importante papel na evolução do genoma e atua como substrato para recombinação por rearranjos cromossômicos (Kidwell e Lisch 2000; Kidwell 2002). Estes elementos podem ser transmitidos tanto verticalmente quanto horizontalmente e estas transferências ocorrem mesmo entre genomas de espécies filogeneticamente distantes (Schneider *et al.* 2013; Tang *et al.* 2015), além de estarem relacionados com adaptação às condições de estresse ambiental (Casacuberta e González 2013).

Sequências repetidas de DNA compreendem uma grande parte do genoma da maioria dos organismos, o que permite uma enorme variação no tamanho dos genomas dos eucariotos. Estão envolvidas no processo de replicação do DNA (Li *et al.* 2002) e na organização estrutural e funcional do genoma em geral, sendo responsáveis por muitas das variações cariotípicas observadas (Kidwell 2002). Essas sequências são divididas em duas categorias, as repetições em tandem e os elementos transponíveis (*transposable elements*). Dentre as repetições em tandem temos os DNAs ribossomais, centromérico e telomérico, sendo que as funções destas sequências há muito são conhecidas. Os elementos transponíveis, por outro lado, foram, por muito tempo, chamados de "DNA lixo" por, aparentemente, não possuírem funções conhecidas no genoma (Schmidt e Heslop-Harrison 1998; Biscotti *et al.* 2015). Essa visão mudou com a

descoberta de funções estruturais, algumas delas envolvidas na regulação da expressão gênica e rearranjos cromossômicos (Kidwell 2002; Burns e Boeke 2012).

Elementos transponíveis (ET) são sequências de DNA que possuem a capacidade de interagir com diferentes porções do genoma, podendo se replicar independentemente do ciclo celular, por possuírem porções codificantes e não ocorrerem em repetições em tandem (Feschotte 2008; Bonchev e Parisod 2013; Casacuberta e González 2013). Essas sequências são classificadas em dois grupos: ETs classe I, também chamados de retrotransposons, e classe II, também chamados de transposons. Os ETs de classe I utilizam a molécula de RNA como intermediária no processo de transposição; já, os de classe II movem-se pelo genoma, utilizando a molécula de DNA como intermediário de transposição (Wicker *et al.* 2007).

Os retrotransposons podem ser divididos em duas subclasses: retrotransposons LTR (*Long Terminal Repeat*) e os retrotransposons não-LTR (*Nonlong Terminal Repeat*). Os LTR possuem extensas repetições nas extremidades 5' e 3' que flanqueiam a sequência central, conhecida como ORF (*Open Reading Frame*) (Volff *et al.* 2001a; Böhne *et al.* 2008). Essa região codifica as proteínas que são necessárias para a transcrição e integração da sequência de cDNA, após a transcrição reversa. Essa sequência possui domínios que codificam proteinase, integrase, RNAse e transcriptase reversa. Já, as sequências não-LTR utilizam promotores internos para promover a transposição, sendo subdivididos em *LINES* (*long interspersed nucleotide elements*) e *SINES* (*short interspersed nucleotide elements*). Os *LINES* possuem regiões codificantes para transcriptase reversa e RNAse, enzimas necessárias para a transposição. Já, os *SINES* não apresentam regiões codificantes, mas, adquirem a maquinaria enzimática necessária para a transposição por meio dos *LINES* (Böhne *et al.* 2008).

Dentre os retrotransposons podemos destacar os ETs do tipo *Rex* (*Rex*1, *Rex*3, *Rex*6), descritos no genoma de espécies de *Xiphophorus* (Volff *et al.* 1999; 2000; 2001a), correspondem a elementos não-LTR abundantes entre os peixes, que têm sido muito estudados a fim de entender sua estrutura, seu envolvimento na regulação gênica, distribuição e sua evolução no genoma (Volff *et al.* 1999; 2000; 2001a; 2001b; Mazzuchelli e Martins 2009; Teixeira *et al.* 2009; Costa *et al.* 2013; Schneider *et al.* 2013; Santos *et al.* 2016; Favarato *et al.* 2017). Os elementos *Rex1* e *Rex3* possuem domínios codificantes para transcriptase reversa, endonucleases apurínica/apirimidínica, enzimas estas necessárias para o processo de transposição, enquanto que *Rex6* também codifica a enzima transcriptase reversa, mas faz uso de uma endonuclease similar à enzima de restrição (REL) (Volff *et al.* 2000; 2001b).

Apesar de receberem nomes similares, as sequências *Rex* possuem diferenças estruturais e são alocadas em famílias de elementos diferentes. *Rex1,* juntamente com o elemento *Babar,* corresponde a uma família de ETs que parece estar relacionada ao clado *CR1* dos elementos do tipo *LINE*. Estas sequências têm uma região conservada na extremidade 3', seguida por repetições em *tandem* de oligonucleotídeos de tamanhos variáveis (Volff *et al.* 2000). *Rex3* pertence à família RTE de retroelementos do tipo não-LTR e, de todos os retrotransposons presentes em peixes, e apresenta a maior distribuição entre os teleósteos, sendo encontrado em espécies que divergiram há 150-200 milhões de anos (Volff *et al.* 1999). Possui truncamentos na extremidade 5' da maioria das cópias e uma cauda na extremidade 3', composta por repetições em tandem de GATG (Volff *et al.* 1999). Adicionalmente, *Rex6* é membro da família *R4* de retroelementos não-LTR, que, juntamente com o elemento *Dong* e *R4,* esteve ativo na evolução do genoma de diversas espécies de peixes, tendo sofrido inúmeras retrotransposições, levando a um grande número de cópias de *Rex6* na maioria das espécies (Volff *et al.* 2001b).

Estas sequências se distribuem de forma distinta em diferentes grupos de peixes. Em estudo com espécies de ciclídeos os retrotransposons *Rex1, Rex3* e *Rex6* encontram-se dispersos por todos os cromossomos, em regiões heterocromáticas e eucromáticas. Estes elementos mostraram alto grau de variabilidade entre as espécies, embora regiões conservadas também foram identificadas, correspondendo aos domínios que codificam enzimas, usadas na transposição (Schneider *et al*. 2013). Pucci *et al.* (2018) observaram sítios de *Rex1* e *Rex3* dispersos em pequenos agrupamentos nos cromossomos de espécies de *Characidium*, não havendo grandes diferenças entre as espécies. Em espécies de *Ancistrus*, o retrotransposon *Rex3* foi encontrado em associação com sítios de DNAr 5S, o que deve ter favorecido sua dispersão. Também foi observada associação do ET com DNAs microssatélites $(GA)_{15}$ e $(CA)_{15}$ (Prizon *et al.* 2018).

Em *Erythrinus erythrinus* (Bloch & Schneider, 1801) foram mapeados sítios de *Rex3* preferencialmente em regiões centroméricas de todos os cromossomos, e foi relatado que este elemento se inseriu dentro da sequência do DNA ribossomal 5S, formando um complexo 5S rDNA/*Rex3,* explicando assim a dispersão da sequência 5S relatada nesta espécie, que se deve à atividade de transposição deste ET (Cioffi *et al.* 2010). Algo similar foi relatado em *Astyanax bockmanni* (Vari & Castro, 2007), onde foram encontrados blocos de *Rex3* sintênicos a blocos de DNAr 18S e heterocromatina. Nessa espécie, a sintenia entre *Rex3* e 18S também foi associada a um mecanismo que promoveu a dispersão do DNAr (Silva *et al.* 2013). Junto a isso,

Pessenda *et al.* (2018) demostraram que o comportamento da sequência de *Rex1* é similar dentro das espécies de *Astyanax*, onde todas as espécies apresentaram este elemento disperso por todos os cromossomos, em regiões heterocromáticas e eucromáticas. Por outro, espécies de *Leporinus* apresentam compartimentalização de *Rex1* e *Rex3*, apresentando acúmulo dessas sequências em regiões heterocromáticas (Borba *et al.* 2013). Dessa forma fica evidente que o comportamento dessas sequências é variado dentro dos diferentes grupos.

A transposição dessas sequências pode ser desencadeada por sinais celulares, poluição ambiental, choques térmicos, dentre outras condições estressantes (Fujino *et al.* 2011; Laudencia-Chingcuanco e Fowler 2012; Miousse *et al.* 2015; Silva *et al.* 2016; Ribeiro *et al.* 2017). Quanto à ativação destes elementos, pela poluição ambiental, foi descrito para *Hoplosternum littorale* (Hancock, 1828), comumente conhecida como tamoatá, um aumento do número de sítios de *Rex*3 em exemplares provenientes de ambientes antropizados, quando comparados a exemplares do ambiente não antropizado. Tal achado deixa evidente que a poluição ambiental foi capaz de influenciar a atividade deste retrotransposon (Silva *et al.* 2016).

Além disso, os diferentes tipos de água dos rios da Amazônia (branca, clara e preta) (Sioli 1984) podem causar mudanças na atividade dos elementos *Rex*, como no estudo de Barbosa *et al.* (2017), onde foi relatado diferentes padrões de expressão de *Rex6* em exemplares de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), coletados em água clara e preta, sendo que os animais coletados na água clara apresentaram maior expressão da sequência, o que indica maior atividade. Junto a isso, em exemplares de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) provenientes de água branca, foi observado um aumento e compartimentalização do *Rex3*, diferente daqueles provenientes de águas claras e pretas, onde o *Rex3* foi disperso (Santos *et al.* 2016).

Mudanças na temperatura também se mostraram eficientes para ativar a transposição de ETs, como relatado para o elemento P em insetos do gênero *Drosophila* (Chakrani *et al.* 1993; Kaminker *et al.* 2002). Existem fortes evidências do papel adaptativo dos ETs na evolução do genoma de *Drosophila*, e, além disso, é atribuído aos ETs um importante papel na adaptação destes organismos a diferentes condições climáticas (González *et al.* 2010). Em peixes, Ribeiro (2013) verificou a ativação da transposição dos elementos *Rex1* e *Rex6* em exemplares de *C. macropomum*, aclimatados a temperaturas inferiores a 23 ºC, bem como a heterocromatinização do genoma destes indivíduos. A atividade desses elementos pode influenciar na atividade dos genes localizados próximos aos locais de inserção, gerando novos padrões de regulação ou até diferentes transcritos, introduzir sítios de *splicing*, introduzir *stop* códons, causar mudanças

epigenéticas, que podem levar à inativação de genes, além de poder causar rearranjos cromossômicos (Casacuberta e González 2013).

Sendo assim, os cenários de mudanças climáticas previstos pelo Painel Intergovernamental sob mudanças climáticas (IPCC) para o ano de 2100 podem causar alterações na atividade de transposição destas sequências. Estes cenários afetariam a região amazônica, reduzindo a evapotranspiração na faixa de 15% a 30%, além de uma redução de 5% a 20% nas taxas de precipitação (Marengo 2007; Nobre *et al.* 2008; Barcellos *et al.* 2009), mudanças que afetariam diretamente a ictiofauna local, dentre as quais encontra-se o tambaqui.

1.3. *Colossoma macropomum*

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é nativo das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, onde é comum em lagos de várzea (Jégu 2003). Trata-se da espécie nativa de maior interesse para a piscicultura, sendo a segunda em termos de criação em cativeiro, ficando atrás apenas da tilápia; sua despesca no ano de 2017 representou 18,2% da produção nacional, sendo a região Norte a maior produtora da espécie (IBGE 2017). Possui características que a torna atrativa para o cultivo em sistemas de criação intensiva, como a fácil obtenção de juvenis, alta produtividade, alta taxa de fecundidade, elevado grau de crescimento, rusticidade, e sobretudo, sua adaptação à criação em cativeiro pela fácil aceitação de rações comerciais (Junk 1985; Araújo-Lima e Goulding 1998; Kubitza 2004; Mendonça *et al.* 2009; Jacometo *et al*. 2010; Dairiki e Silva 2011).

Junto a isso, é tido como espécie “modelo” para estudos de peixes amazônicos, pois tem sido utilizado em diferentes abordagens, como análises de adaptações fisiológicas da espécie (Kochhann *et al*. 2015; de Oliveira e Val 2016; Wood *et al.* 2017); estudos de manejo em cativeiro (Inoue *et al.* 2014); manipulação para a obtenção de híbridos em cativeiro (Silva *et al.* 2007; Gomes e Silva 2009); estudos parasitológicos e reprodutivos (Araújo-Lima e Goulding 1998; Morey e Malta 2016) e análises genéticas (Ribeiro 2013; Ribeiro *et al*. 2017; Martínez *et al.* 2017; Silva *et al*. 2017). Estudos cromossômicos evidenciaram número diploide de 54 cromossomos, todos com dois braços, número fundamental (NF) de 108 e a espécie não apresenta cromossomos sexuais diferenciados. A heterocromatina está presente preferencialmente nas regiões centroméricas, e as regiões organizadoras de nucléolos (RONs) estão localizadas na porção terminal dos braços longos de dois pares metacêntricos (Nakayama *et al.* 2012; Ribeiro *et al.* 2014).

Outros marcadores já mapeados na espécie são as sequências de DNA repetitivo. Com relação aos DNAs ribossomais, a espécie apresenta sítios de 18S na região terminal dos braços longos de três pares (6,10 e 12) e sítios de 5S em dois pares (11 e 13) (Nakayama *et al.* 2012; Ribeiro *et al.* 2014). Além disso, a espécie apresenta elementos transponíveis do tipo *Rex* dispersos por todos os cromossomos (Ribeiro *et al.* 2017), no entanto, o comportamento dessas sequências no genoma da espécie ainda não é conhecido em situações de estresse ambiental.

Deste modo, a fim de contribuir para a elucidação desta questão foi proposto para o presente trabalho, um experimento em microcosmo, simulando aumentos de temperatura de acordo com o previsto pelo IPCC, e a espécie de peixe escolhida foi o tambaqui (*C. macropomum*) por tratar-se de um organismo modelo para estudos na Amazônia.

2. Objetivos

2.1. Geral:

- Gerar informações acerca do comportamento e distribuição dos ETs da família *Rex*, nos cromossomos do tambaqui, frente aos diferentes cenários de mudanças climáticas propostos pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC).

2.2. Específicos:

- Verificar se os diferentes cenários climáticos propostos pelo IPCC exercem influência sobre o padrão de distribuição de heterocromatina na espécie *C. macropomum*.

- Verificar a localização cromossômica dos retroelementos do tipo *Rex* (*Rex* 1, *Rex* 3 e *Rex* 6) em tambaquis submetidos aos diferentes cenários climáticos.

3. Material e métodos

3.1. Delineamento experimental

Para este estudo foi utilizado o material previamente obtido no período de 01 de novembro de 2016 a 15 de dezembro de 2016 (45 dias), pelo projeto "Caracterização de elementos transponíveis em tambaqui (*Colossoma macropomum*) como subsídio para piscicultura" (EDITAL N. 022/2013 – FIXAM/AM), projeto este que esteve vinculado ao projeto ADAPTA (CEUA Nº026/2015).

3.1.1. Cenários Climáticos em Microcosmo

O microcosmo é um ambiente criado para simular mudanças climáticas de acordo com o Quarto Relatório do IPCC (2007). Sua estrutura conta com quatro salas climatizadas cuja temperatura, umidade do ar e concentração de dióxido de carbono são controladas 24 horas por dia. A sala 1 é destinada ao ambiente controle, onde as condições de umidade do ar, temperatura e concentração de CO_2 seguem, em tempo real, as condições daquele momento. A sala 2 simula as condições do cenário brando (**B1**) com aumento de 1,5 ºC e 200ppm de CO_2, em relação à sala 1. A sala 3 simula as condições do cenário intermediário (**A1B**) com aumento de 2,5 ºC e 400ppm de CO_2 em relação à sala 1. A sala 4 simula as condições do cenário mais extremo (**A2**) com aumento de 4 ºC e 800ppm de CO_2 em relação à sala 1. Os ambientes possuem suas variáveis controladas, em tempo real, de acordo com as condições ambientais do dia. As salas possuem um *timer* que controla automaticamente as luzes, estabelecendo assim um regime de 12 horas com luz e 12 horas sem luz, de acordo com as condições ambientais da região onde está localizado o microcosmo. Este possui um sistema interno que capta os valores ambientais das variáveis simuladas e os armazena em um computador exclusivo para isso.

3.1.2. Exposição aos cenários climáticos em microcosmo

Para a realização do experimento no microcosmo, sessenta (60) juvenis de tambaqui foram transportados da Fazenda Santo Antônio (Rio Preto da Eva – AM) para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Antes dos indivíduos serem expostos aos diferentes cenários climáticos, eles passaram por um período de aclimatação em ambiente externo por 30 dias. Após a aclimatação externa os animais foram separados em quatro grupos experimentais de 15 indivíduos, sendo cada grupo aclimatado em uma sala do microcosmos por um período de dois dias. A primeira sala simulou

as condições de temperatura, umidade do ar e concentração de CO_2 do dia, por meio de um sensor localizado em uma área de mata no INPA, sendo esta, destinada ao grupo controle; a segunda sala teve um aumento de 1,5 ºC e 200ppm de CO_2 em relação à primeira; a terceira teve um aumento de 2,5 ºC e um aumento de 400ppm de CO_2 em relação à primeira; e, na quarta esse aumento foi de 4,5 ºC e 850ppm de CO_2 em relação à primeira. Ao fim de 45 dias de experimento os peixes foram levados para o Laboratório de Genética Animal – LGA/INPA, onde foram eutanasiados e tiveram seu rim e tecido muscular coletados.

3.2. Obtenção dos cromossomos metafásicos

A obtenção das preparações cromossômicas seguiu o protocolo de Gold *et al.* (1990). Os exemplares tiveram o rim removido, colocado em 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 e dissociado com seringas de vidro. O material foi transferido para tubos falcon de 15 mL. Adicionou-se 5 µL (cinco gotas) de solução de colchicina 0,025% por 30 minutos, para cessar a divisão mitótica, deixando agir em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e acrescentou-se 10 mL de solução hipotônica de KCl (0,075M), deixando por 28 a 30 minutos em estufa a 37 ºC; ao término centrifugou-se por 10 minutos. A suspensão de células foi fixada em solução de metanol e ácido acético (3:1) por três ciclos de ressuspensão e centrifugação por 10 minutos, sendo o material conservado à -20 ºC em tubos de 1,5mL para análises posteriores.

3.3.Bandeamento C

A detecção dos blocos heterocromáticos foi feita segundo Sumner (1972), com algumas modificações. As lâminas, contendo as preparações, passaram por tratamento em HCl 0,2N a 45 ºC por 2 minutos, lavadas em água destilada à temperatura ambiente e secas ao ar. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução de hidróxido de bário a 5%, recém preparada e filtrada, a 45 ºC, por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida, para interromper a ação do hidróxido de bário, as lâminas foram imersas em HCl 0,2N (46 ºC) por 30 segundos, sendo posteriormente lavadas em água destilada. Após secas, as lâminas foram incubadas em solução 2xSSC (Cloreto de Sódio 0,3M e Citrato Trisódico 0,03M, pH 6,8) em banho-maria a 60 ºC, por um período de 30 minutos, lavadas e secas ao ar. Posteriormente, foram coradas com Giemsa 10% em tampão fosfato 0,06M e pH 6,8 por 10 minutos, lavadas em água corrente e secas novamente ao ar.

3.4.Extração de DNA

A extração do DNA foi feita a partir do tecido muscular do tambaqui, utilizando-se o Kit de extração Wizard® (Promega), segundo as recomendações do fabricante. Em um tubo tipo *eppendorf* de 1,5 mL foi adicionado o tecido, juntamente com 300 µL de solução de EDTA + *Nuclei Lysys Solution* (50 µL de EDTA 0,5M + 250 µL de *Nuclei Lysys Solution*) e 10 µL de proteinase K. Esta mistura foi incubada por pelo menos 3 horas à 55 ºC, para dissociar o tecido. Após a dissociação do tecido, adicionou-se RNAse à mistura, sendo esta incubada por 30 minutos à 37 ºC. Após a ação da RNAse foi adicionado à mistura uma solução *protein precipitation solution* e o tubo levado ao vortex por 20 segundos, até a mistura espumar. Após isso foi deixada no freezer por 5 minutos. Os tubos, contendo a solução, foram centrifugados por 8 minutos à 13000 rpm, o sobrenadante foi transferido para tubos novos, adicionando 300 µL de isopropanol gelado, centrifugando-se novamente por 8 minutos à 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 300 µL de etanol 70% gelado foi adicionado e novamente centrifugado por 8 minutos à 13000 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e 300 µL de etanol 100% foram adicionados e os tubos centrifugados por 8 minutos à 13000 rpm. Ao fim desta etapa os tubos foram deixados à 37 ºC para secarem, em seguida foram adicionados 50 µL de *DNA Rehydration Solution* e deixados overnight à 37 ºC.

A visualização e análise do DNA no gel foi feita no transluminador de luz ultravioleta (Loccos Biotechnology). Adicionalmente, quantificações em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare) também foram realizadas.

3.5.Amplificação das sequências

Para a amplificação dos elementos transponíveis do tipo *Rex* foi utilizada a técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) em termociclador (T100™ *Thermal Cycler*) com os seguintes *primers*: para *Rex1* RTX1-F1 (5'TTC TCC AGT GCC TTC AAC ACC) e RTX1-R3 (5'TCC CTC AGC AGA AAG AGT CTG CTC) (Volff *et al.* 2000); para *Rex3* RTX3-F3 (5′-CGG TGA YAA AGG GCA GCC CTG-3′) e RTX3-R3 (5′-TGG CAG ACN GGG GTG GTG GT-3′) (Volff *et al.* 1999; 2001a); e *Rex6*-Medf1 (5′- TAA AGC ATA CAT GGA GCG CCA C-3′), e *Rex6*-Medr2 (5′- GGT CCT CTA CCA GAG GCC TGG G-3′) para *Rex6* (Volff *et al*. 2001b). A eficácia da reação foi verificada após corrida em gel de agarose 1% e as amostras foram quantificadas no equipamento NanoVue Plus espectrofotômetro (GE Healthcare).

3.6.Marcação de Sonda

Os produtos de PCR foram marcados com Digoxigenina via reação de *Nick Translation*, utilizando o kit DIG-Nick^{TM} Translation Mix (Roche) de acordo com as orientações do fabricante, para a obtenção das sondas. Para cada lâmina foram pipetados os seguintes componentes em tubo de 1,5 mL no gelo: 1,5 µL de DNA (200 µg/µL), 2 µL de mix do Kit, e 6,5 µL H_2O milli-Q. Os reagentes foram misturados, centrifugados brevemente e incubados por 90 minutos a 16 ºC em termociclador. A reação foi interrompida com a adição de 1 µL de EDTA 0,5M, e o material foi colocado no termociclador por 10 minutos e em seguida foi colocado em freezer -20 ºC até o uso.

3.7.Mapeamento cromossômico

Para o mapeamento cromossômico foi seguido o protocolo descrito por Pinkel *et al.* (1986) com modificações. As lâminas foram tratadas com 100 µL de RNase 40 µg/mL (0,4 µL de RNase 10 mg/mL e 99,6 µL de 2XSSC) por 1 hora e 30 minutos em câmara úmida a 37 ºC. Em seguida seguiram duas lavagens em 2xSSC durante 10 minutos cada, e desidratadas em série alcoólica 70%, 85% e 100% (etanol mantido no freezer) durante 10 minutos cada. Após secas, o material passou por um pré-tratamento em formaldeído 1%. As lâminas contendo material cromossômico foram mergulhadas em formamida 70% em 2xSSC por 5 minutos a 70 °C, e novamente desidratadas em etanol 70%, 85% e 100% a -20 °C por 5 minutos cada. Após isso, as lâminas foram secas ao ar.

Para a preparação da solução de hibridização adicionou-se em um tubo tipo *eppendorf* 20 µL de formamida 100% (50% do volume final), 8 µL de sulfato de dextrano 50%, 4 µL da sonda A, 4 µL de 20xSSC (concentração final de 2xSSC) e 4 µL de H_2O obtendo um volume final de 40 µL. A sonda foi desnaturada a 99 ºC por 10 minutos e passada imediatamente ao gelo. A etapa de hibridização foi realizada colocando-se 40 µL de solução de hibridização sobre a lamínula e invertendo a lâmina sobre a lamínula. As lâminas foram mantidas com o material voltado para baixo em câmara úmida (2xSSC) a 37 ºC durante uma noite (aproximadamente 16 horas). Em seguida as lâminas foram lavadas 2 vezes em formamida 15%, 0,2xSSC pH 7,0 a 42 ºC durante 10 minutos cada, 3 vezes em 0,1xSSC a 60 ºC, por 5 minutos cada, e em solução Tween 0,5%, temperatura ambiente durante 5 minutos.

Após isso foi feita a detecção do sinal, que consistiu em incubar as lâminas em tampão NFDM (Nonfat dry milk) (5% NFDM/4xSSC) por 15 minutos e lavá-las 2 vezes com Tween

5%, temperatura ambiente por 5 minutos. Em um tubo tipo *eppendorf* foi preparado um mix contendo 20 µL de anti digoxigenina-rodamina (1:200). A lâmina foi invertida sobre a lamínula e incubada por 60 minutos em câmara úmida a 37 ºC. Passado esse período a lâmina foi lavada 3 vezes com Tween 5%, temperatura ambiente por 5 minutos, desidratada em série alcoólica 70, 85 e 100% durante 5 min cada, e seca ao ar.

Após todo esse processo, a lâmina foi montada com 20 µL de antifade + 1 µL de DAPI e coberta com lamínula. Os cromossomos metafásicos foram analisados e fotografados em um microscópio de fluorescência Olympus BX51. Para captura das imagens foi utilizado o software Image-PRO MC 6.0 e as melhores metáfases tiveram seus cromossomos emparelhados no PhotoShop CS6.

3.Resultados

Foram analisadas cerca de 30 metáfases por indivíduo de cada condição. Número diploide foi igual a 54 cromossomos (26m + 28sm) e número fundamental (NF) 108. Em relação à distribuição da heterocromatina constitutiva, encontramos blocos na região centromérica de todos os cromossomos dos indivíduos das salas 1 (controle), 2 (cenário B1) e 3 (cenário A1B). Os indivíduos aclimatados ao cenário extremo (A2), sala 4, apresentaram, além de blocos centroméricos, blocos conspícuos nas regiões terminais do braço curto e braço longo (pares 4, 5, 6 e 7); blocos na região terminal do braço longo (pares 13, 15, 16, 17, 24 e 27); blocos conspícuos no braço curto do par 1 e no braço longo dos pares 2 e 21; e blocos intersticiais nos 19 e 20 (Figura 1).

O mapeamento dos elementos transponíveis do tipo *Rex* resultou em marcações dispersas em todos os cromossomos. Nos indivíduos do controle, as marcações para *Rex 1* foram difusas, sem nenhum sinal mais evidente. Nos cenários B1 e A1B foram observadas marcações difusas em todos os cromossomos e também marcações conspícuas, formando pequenos blocos. Já, no cenário A2 verificou-se um grande aumento de marcações desta sequência, sendo que alguns cromossomos estiveram marcados quase por completo, com marcações mais evidentes (pares 15, 18 e 24) (Figura 2).

O elemento *Rex3* nos cenários B1 e A1B, bem como no controle, apresentou-se como marcações sutis, indicando pouca quantidade de sítios deste retrotransposon. No entanto, nos animais aclimatados no cenário extremo (A2) observou-se um aumento de sítios deste ET, com marcações conspícuas em vários pares cromossômicos tanto em regiões de heterocromatina quanto de eucromatina, sendo observado alguns pares com blocos evidentes nas regiões terminais (pares 1, 3, 4, 6, 15 e 23) (Figura 3).

O elemento *Rex6* mostrou um comportamento muito similar em todos os cenários testados neste estudo. No cenário controle foram verificadas marcações difusas por todo o genoma. Nos cenários A1B, A2 e B1 a sequência continuou apresentando marcações difusas por todos os cromossomos, em regiões de heterocromatina e eucromatina, sem nenhuma variação visível entre os indivíduos aclimatados aos diferentes cenários (Figura 4).

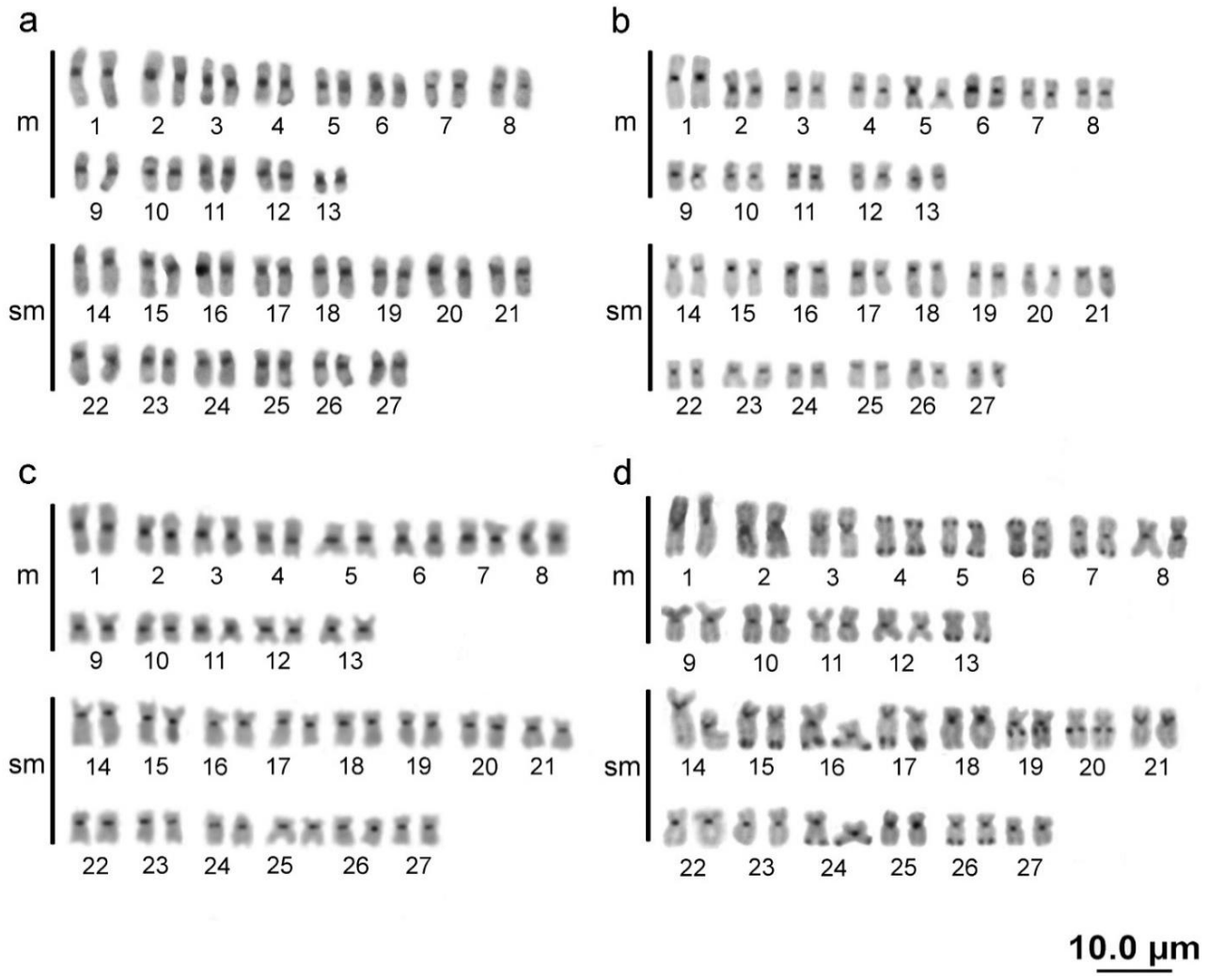

Figura 1. Cariótipos de *C. macropomum* corados para banda C: (a) Sala 1 – controle; (b) Sala 2 - Cenário B1; (c) Sala 3 - Cenário A1B; (d) Sala 4 - Cenário A2.

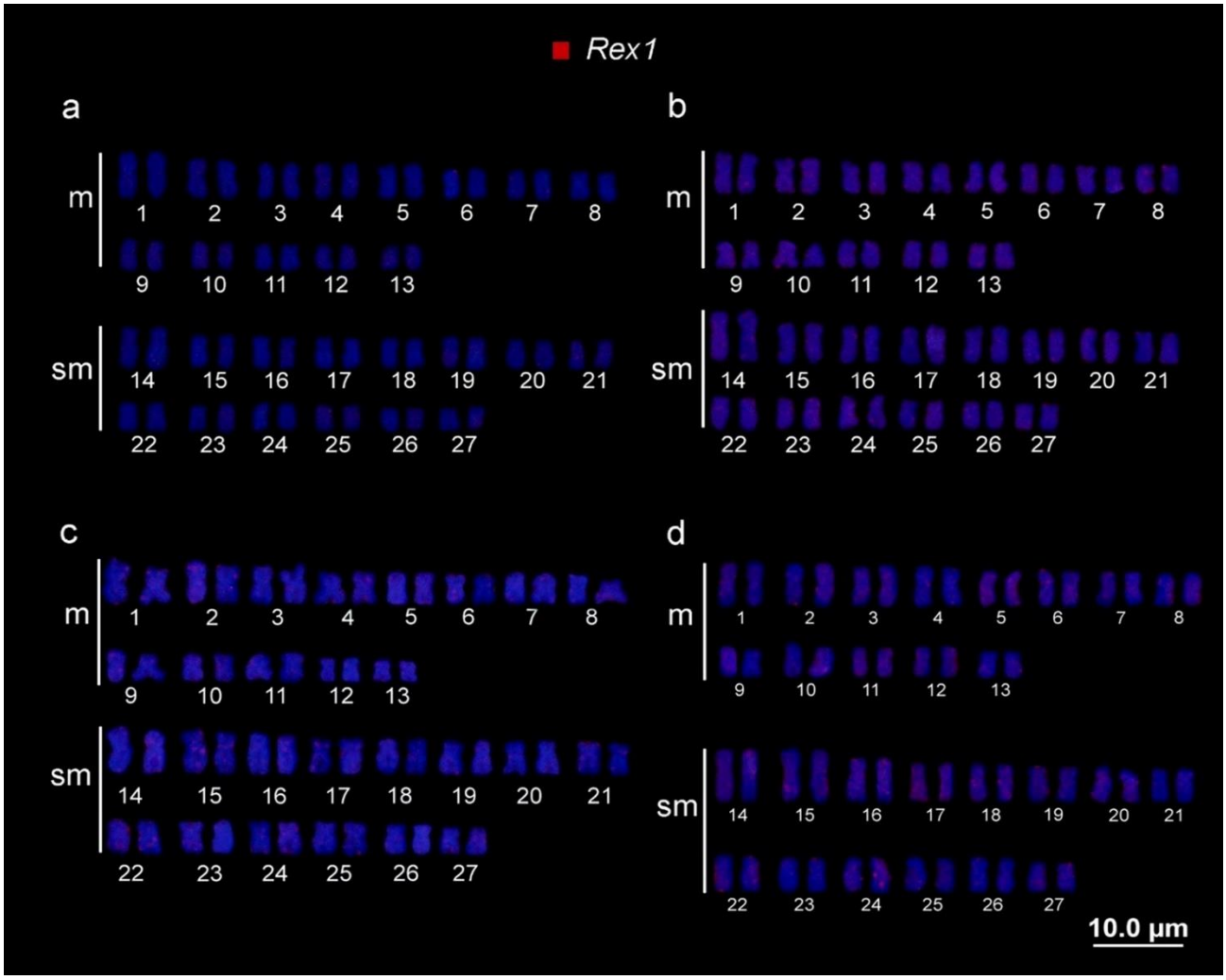

Figura 2. Mapeamento cromossômico do ET *Rex1* em *C. macropomum*: (a) Sala 1 - Controle; (b) Sala 2 - Cenário B1; (c) Sala 3 - Cenário A1B; (d) Sala 4 - Cenário A2.

Figura 3. Mapeamento cromossômico do ET *Rex3* em *C. macropomum*: (a) Sala 1- Controle; (b) Sala 2 - Cenário B1; (c) Sala 3 - Cenário A1B; (d) Sala 4 - Cenário A2.

Figura 4. Mapeamento cromossômico do ET *Rex6* em *C. macropomum*:(a) Sala 1 - Controle; (b) Sala 2 - Cenário B1; (c) Sala 3 - Cenário A1B; (d) Sala 4 - Cenário A2.

4.Discussão

Mudanças climáticas têm sido parte importante de grandes discussões entre Organizações em vários países, tanto que foi criado o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC). E, estudos envolvendo diferentes espécies amazônicas, submetidas a um ambiente de microcosmo, sugerem que as mudanças climáticas têm potencial de interferir na dinâmica do bioma amazônico (Azevedo 2015; Silva 2016; Martins *et al.* 2017; Gonçalves *et al.* 2018; Lopes *et al.* 2018).

O tambaqui (*C. macropomum*), quando exposto às alterações climáticas previstas no IPCC, teve seus parâmetros hematológicos alterados, com aumento significativo nos níveis de cortisol, colesterol, glicose e de hematócrito (Dragan 2015; Oliveira e Val 2017). Prado-Lima e Val (2016), num outro estudo, analisaram o transcriptoma de *C. macropomum* exposto a cenários de mudanças climáticas, também submetido ao ambiente de microcosmo, e observaram que a resposta da espécie a estas alterações de temperatura e CO_2 é complexa e envolve diferentes grupos gênicos. Após quinze dias sob as condições dos cenários B1, A1B e A2 foram verificadas alterações no padrão de expressão gênica dos genes codificantes das *heat shock proteins* (Hsps), que estão relacionados a respostas a choque térmico, onde houve um aumento na atividade dos genes codificadores dessas proteínas. Este grupo de proteínas está diretamente relacionado à tolerância térmica da espécie. Além disso, genes relacionados a vias metabólicas sofreram regulação negativa, como no caso daqueles relacionados às proteínas que atuam no ciclo do ácido cítrico e cadeia transportadora de elétrons. Isso indica supressão de várias vias metabólicas afim de garantir a homeostase e superar o estresse térmico.

Os dados do presente trabalho mostram, que além de alterações metabólicas e de expressão gênica descritas anteriormente, o tambaqui também responde aos cenários mais extremos de mudanças climáticas por meio de alterações cromossômicas, principalmente no que diz respeito à distribuição de elementos transponíveis do tipo *Rex* e de blocos heterocromáticos. Embora a localização dispersa dos retroelementos *Rex* corrobore o já descrito anteriormente para o tambaqui (Ribeiro *et al.* 2017), no cenário A2, que simula alterações de temperatura e CO_2 mais extremas, foi possível observar um aumento na distribuição dos retroelementos *Rex1* e *Rex3*. Esse aumento, provavelmente, é ocasionado pela duplicação dessas sequências como resposta ao ambiente estressante, uma vez que a transposição destes elementos no genoma hospedeiro não ocorre ao acaso, e sim mediado por sinais celulares e/ou fatores externos, como alterações na temperatura, presença de parasitas, dentre outros tipos de

estresse (Charlesworth e Langley 1986; Deininger *et al.* 2003; Almeida e Carareto 2005; Burt e Trivers 2006).

A percepção de uma situação de estresse pelo organismo pode induzir alterações genéticas e gerar respostas fisiológicas rápidas, para que o mesmo possa tolerar as mudanças ambientais, alterando assim a atividade de genes de defesa, que podem ser ativados ou inativados, inclusive por processos epigenéticos. Ainda nesse contexto, também pode haver a indução do processo de transposição de elementos transponíveis, que pode criar novas proteínas ou modificar as já existentes, afetando assim o fenótipo do hospedeiro e desempenhando um importante papel na adaptação rápida a mudanças ambientais (Capy *et al*. 2000). Os ETs podem, através de sua transposição, causar inserção de novos éxons, gerar *stop códons*, agregar fragmentos de diferentes genes, gerar retrotranscrição de mRNAs e inserção deste retrogene (Casacuberta e Gonzalez 2013; Rey *et al.* 2016).

Os ETs, sob condições normais, sofrem repressão por meio de mecanismos de regulação gênica, entretanto estresses ambientais podem causar interrupção nessa regulação e provocar a ativação da transposição destas sequências. A duplicação e a transposição desses elementos aumentam tanto o seu tamanho, quanto a diversidade genética dentro e entre espécies. Quando tal atividade é induzida por estresse, pode representar a diversidade genética necessária para que as espécies consigam se adaptar às mudanças (Casacuberta e González 2013). O aumento dos sítios de *Rex1* e *Rex3*, observado em nosso estudo, sugere que essas sequências podem ter um papel importante na adaptação às mudanças ambientais, que neste caso foi temperatura e níveis de CO_2, dada a capacidade desses retroelementos de gerar mutações e variabilidade genética no genoma do hospedeiro.

Embora tenha ocorrido um aumento no número de sítios de *Rex1* e *Rex3*, a distribuição dessas sequências se deu de forma diferente. Não houve indícios de compartimentalização das sequências *Rex1* e nem correspondência com blocos heterocromáticos, sugerindo que a dispersão dessa sequência é controlada por um mecanismo distinto da heterocromatinização, e não detectado com as técnicas aqui empregadas. Já, para o ET *Rex3* é possível sugerir que esta sequência tende à compartimentalização, principalmente em regiões teloméricas, o que foi observado em vários pares cromossômicos. Ainda, que a localização de blocos de *Rex3* coincidentes com porções heterocromáticas indica um processo de heterocromatinização (pares 1, 4, 6, 13 e 26) que deve ter ocorrido como resposta epigenética ao estresse ambiental e à atividade deste ET (Figura 5).

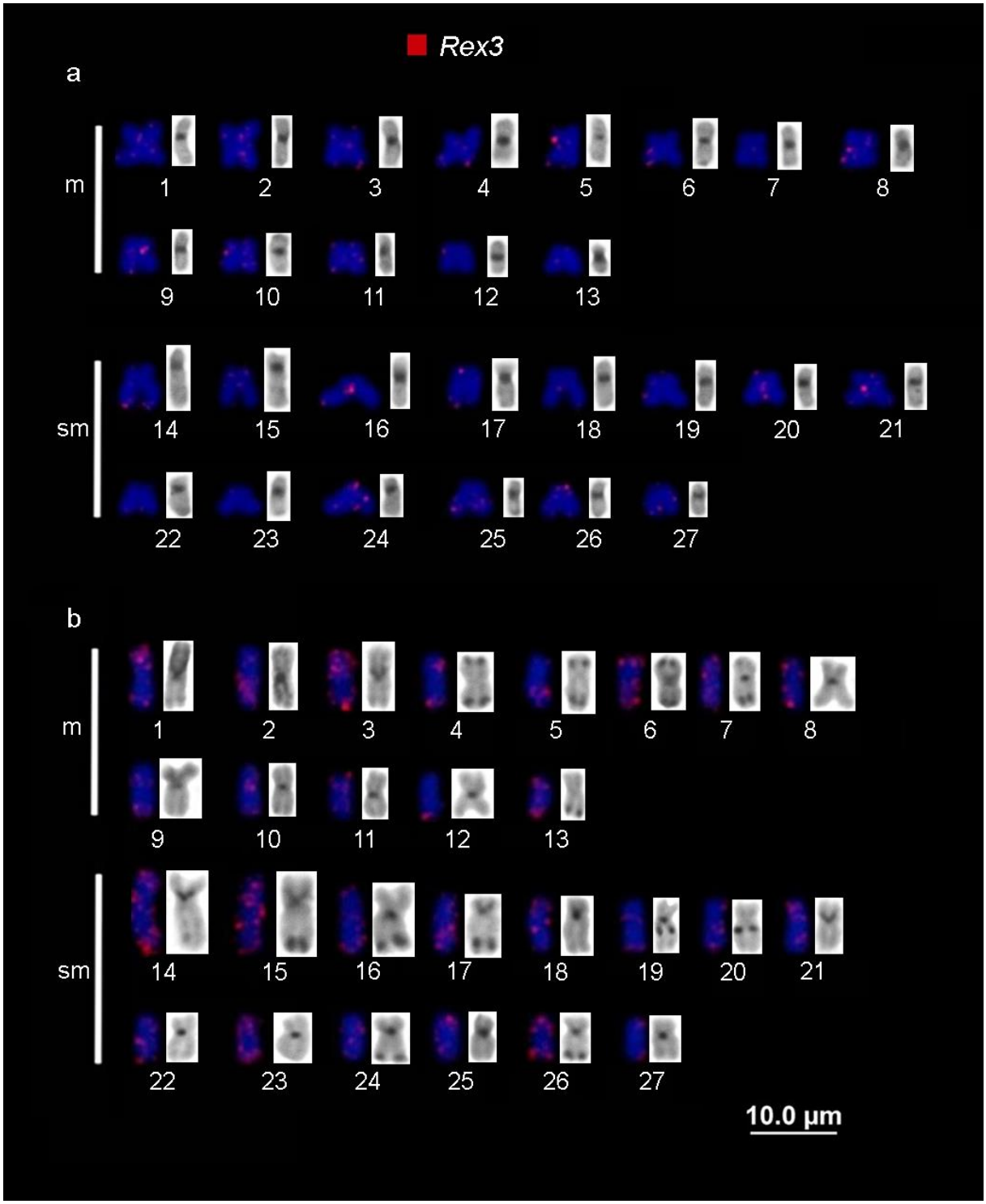

Figura 5. Comparação entre a localização de blocos heterocromáticos e blocos do retroelemento *Rex3* em *C. macropomum.* (a) Cenário controle; (b) Cenário A2.

Alguns trabalhos, envolvendo peixes amazônicos, relacionam o processo de heterocromatinização ao aumento de sítios de sequências *Rex*. Silva *et al.* (2016), por exemplo, compararam peixes provenientes de ambiente poluído com peixes de ambiente não poluído e verificaram um aumento no número de sítios de *Rex* e de blocos heterocromáticos naqueles coletados em ambiente alterado pela poluição. Além disso, resultados similares foram encontrados por Ribeiro (2013), submetendo *C. macropomum* a temperaturas inferiores a 22 ºC. Nesse estudo, o padrão de heterocromatina encontrado pela autora foi muito similar ao aqui observado, com blocos conspícuos nas regiões centroméricas e teloméricas de diversos pares cromossômicos, indicando um processo de heterocromatinização frente ao estresse térmico.

Os elementos transponíveis têm uma estreita relação com componentes epigenéticos (CE), onde muitas dessas sequências estão marcadas por um radical metil ($-CH_3$) pela ação de DNA metiltransferases, que podem inibir sua atividade em condições normais. No entanto, mudanças climáticas podem perturbar a regulação da atividade desses ETs, levando à mobilização e transposição destes (Rey *et al.* 2016). Por outro lado, os CE estão relacionados com ajustes fisiológicos rápidos como no caso do Polychaeta *Spiophanes tcherniai* (Fauvel 1950), que quando exposto a estresse térmico sofre uma série de ajustes epigenéticos, levando a mudanças fisiológicas, necessárias para adaptação às novas condições (Marsh e Pasquale 2014). A atividade de transposição de elementos móveis pode causar silenciamento de genes próximos ao local de inserção e/ou regular a atividade de transposição de ETs, por meio de respostas epigenéticas, como observado no presente estudo, onde verificamos heterocromatinização associada ao aumento do número de sítios de *Rex3*.

Essa correlação não foi observada no mapeamento da sequência *Rex6*, que não mostrou diferença significativa na sua localização, entre os diferentes cenários climáticos, o que pode ser explicado pelo fato dessa sequência possuir características próprias e não ser filogeneticamente relacionada às outras, estando alocada inclusive em uma superfamília diferente de ETs (Volff *et al.* 1999; 2000; 2001b), diferindo na maneira com que esses retroelementos interagem com o genoma hospedeiro. As sequências *Rex1* e *Rex3* utilizam uma maquinaria enzimática muito similar entre si durante a transposição, diferente de *Rex6*, que utiliza, durante sua atividade, uma endonuclease similar a uma enzima de restrição. Ainda, estudos relatam que o *Rex6* foi eliminado, por pressão seletiva, em algumas espécies de Characiformes (Borba *et al.* 2013). Entretanto, este ET foi observado no tambaqui em condições naturais (Barbosa *et al.* 2017), mas com maior expressão em águas claras. No híbrido tambacu

(*C. macropomum* X *Piaractus mesopotamicus*) (Ribeiro *et al.* 2017) ele também teve um aumento significativo. Porém, no presente trabalho e em Ribeiro (2013) o seu comportamento não foi modificado com aumento/diminuição de temperatura, o que nos leva a sugerir que o estresse térmico não induz à mobilização desta sequência.

Sendo assim, sugerimos que a atividade dos ETs *Rex1* e *Rex3* está relacionada com a adaptação da espécie modelo (o tambaqui) nas condições testadas, tendo estas duas sequências sofrido um aumento no número de sítios. No entanto, análises aprofundadas envolvendo expressão de diferentes sequências nas condições utilizadas no presente estudo são necessárias para que se possa compreender os efeitos moleculares gerados por esse aumento da atividade de transposição destas sequências.

5.Conclusões

A diferença no comportamento dos três marcadores pode ser devido às próprias características de cada ET, como o modo de transposição ou até mesmo o tipo de regulação, ao qual essas sequências estão sujeitas. Além disso, estes dados nos mostram que os retrotransposons do tipo *Rex* são sequências que possuem comportamento muito mais dinâmico do que imaginado *a priori* e são bons marcadores para se detectar mudanças ambientais.

Os retroelementos do tipo *Rex* têm sua transposição induzida por diferentes fatores no tambaqui, onde *Rex1* e *Rex3* mostraram-se sensíveis a variações de temperatura, no entanto *Rex6* não responde a este agente estressor. Dessa forma, *Rex1* e *Rex3* mostraram-se bons marcadores frente às condições testadas.

Nossos dados evidenciaram uma relação entre blocos de retroelementos e blocos heterocromáticos, o que nos leva a crer que existe uma relação entre a mobilização das sequências *Rex* e o surgimento de padrões epigenéticos, mediante as condições aqui testadas. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para elucidarmos esta relação e esclarecer os prováveis mecanismos moleculares que estariam envolvidos na adaptação dos organismos amazônicos, frente a mudanças climáticas.

Referências Bibliográficas

Almeida, L.M.; Carareto, C.M.A. 2005. Origem, proliferação e extinção de elementos transponíveis: qual seria a importância da transferência horizontal na manutenção deste ciclo? *Série Monografias SBG.* Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 43p.

Ambrizzi, T.; Rocha, R.P.; Marengo, J.A.; Pisnitchenco, I.; Nunes, L.A.; Fernandez, J.P.R. 2007. *Cenários regionalizados de clima no Brasil e América do Sul para o século XXI: Projeções de clima futuro usando três modelos regionais. Relatório 3, Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Diretoria de Conservação da Biodiversidade*. São Paulo, São Paulo. 108p.

Araújo-Lima, C.A.R.M.; Goulding, M. 1998. *Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Sociedade Civil Mamirauá/CNPq/Rainforest Alliance, Brasil. 186p.

Azevedo, J.B. 2015. *Análise do ciclo biológico do Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) exposto a cenários de mudanças climáticas previstas pelo IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change).* Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas. 53pp.

Barbosa, C.M.; Mareco, E.A.; Silva, M.D.P.; Martins, C.; Costa-Alves, F.A. 2017. Differential expression of a retrotransposable element, *Rex6*, in *Colossoma macropomum* fish from different Amazonian environments. *Mobile Genetic Elements*, 4: 4, e30003.

Barcellos, C.; Monteiro, A.M.V.; Corvalán, C.; Gurgel, H.C.; Carvalho, M.S.; Artaxo, P.; Hacon, S.; Ragoni, V. 2009. Climatic and environmental changes and their effect on infectious diseases: scenarios and uncertainties for Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 18(3): 285-304.

Biscotti, M.A.; Olmo, E.; Heslop-Harrison, J.P. 2015. Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome research*, 23(3): 415-420.

Böhne, A.; Brunet, F.; Galiana-Arnoux, D.; Schultheis, C.; Volff, J.N. 2008. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Research*, 16: 203-215.

Bonchev, G.; Parisod, C. 2013. Transposable elements and microevolutionary changes in natural populations. *Molecular Ecology*, 13: 765-775.

Borba, R.S.; da Silva, E.L.; Parise-Maltempi, P.P. 2013. Chromosome mapping of retrotransposable elements *Rex1* and *Rex3* in *Leporinus* Spix, 1829 species (Characiformes: Anostomidae) and its relationships among heterochromatic segments and W sex chromosome. *Mobile Genetic Elements*, 3(6): e27460.

Burns, K.H.; Boeke, J.D. 2012. Human transposon tectonics. *Cell*, 149: 740–752.

Burt, A.; Trivers, R. 2006. *Genes in conflict: the biology of selfish genetic elements*. Cambridge: Harvard University Press, p. 228-300.

Capy, P. 1998. *Dynamics and Evolution of Transposable Elements*. 1st. France: Landes Bioscience, 197p.

Casacuberta, E.; González, J. 2013. The Impact of transposable elements in environmental adaptation. *Molecular Ecology*, 22: 1503–1517.

Chakrani, F.; Capy, P.; David, J.R. 1993. Development temperature and somatic excision rate of marine transposable element in three natural populations of *Drosophila simulans*. *Genetics Selection Evolution*, 25: 121-132.

Charlesworth, B.; Langley, C.H. 1986. The evolution of self-regulated transposition of transposable elements. *Genetics*, 112: 359-383.

Cioffi, M.B.; Martins, C.; Bertollo, L.A.C. 2010. Chromosome spreading of associated transposable elements and ribosomal DNA in the fish *Erythrinus erythrinus*. Implications for genome change and karyoevolution in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1): 271.

Costa, G.W.W.F.; Cioffi, M.B.; Bertollo, L.A.C.; Molina, W.F. 2013. Transposable elements in Fish Chromosomes: A Study in the Marine Cobia Species. *Cytogenetic and Genome Research*, 141: 126-132.

Dairiki, J.K.; Silva, T.B.A. 2011. *Revisão de Literatura: Exigências nutricionais do tambaqui-compilação de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros*. Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, AM.

Dragan, F.G. 2015. *Respostas fisiológicas e metabólicas do tambaqui (Colossoma macropomum, Cuvier 1818) às alterações climáticas previstas pelos diferentes cenários*

do IPCC para o ano de 2100. Dissertação de mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas. 82pp.

Deininger, P.L.; Moran, J.V., Batzer M.A, Kazazian, J.R.H.H. 2003. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13: 651–658.

Favarato, R.M.; Ribeiro, L.B.; Feldberg, E.; Matoso, D.A. 2017. Chromosome mapping of Transposable Elements of the *Rex* Family in the bristle nose Catfish, *Ancistrus* (Siluriformes; Loricariidae), from the Amazon Region. *Journal of Heredity*, 108(3): 254–261.

Feschotte, C. 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nature Reviews Genetics*, 9(5): 397-405.

Foden, W.B.; Butchart, S.H.; Stuart, S.N.; Vié, J.C.; Akçakaya, H.R.; Angulo, A.; Donner, S.D. 2013. Identifying the world's most climate change vulnerable species: a systematic trait-based assessment of all birds, amphibians and corals. *PloS one*, 8(6): e65427.

Gilman, S.E.; Urban, M.C.; Tewksbury, J.; Gilchrist, G.W.; Holt, R.D. 2010. A framework for community interactions under climate change. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 325–331

Gold, J.R.; Li, Y.C.; Shipley, N.S.; Powers, P.K. 1990. Improved methods for working with fish chromosomes with a review of metaphase chromosome banding. *Journal of Fish Biology*, 37: 563-575.

Gomes, L.C.; Silva, C.R. 2009. Impact of Pound management on tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier), production during growth-out phase. *Aquaculture Research*, 40: 825-832.

Gonçalves, L.M.F.; Silva, M.D.N.P.D.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 2018. Differential survivorship of congeneric ornamental fishes under forecasted climate changes are related to anaerobic potential. *Genetics and molecular biology*, 41(1): 107-118.

González, J.; Karasov, T.L.; Messer, P.W.; Petrov, D.A. 2010. Genome-wide patterns of adaptation to temperate environments associated with transposable elements in *Drosophila*. *Plos Genetics*, 6(4): e1000905.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. *Produção Pecuária Municipal 2015.* Rio de Janeiro, V. 43.

Inoue, L.A.K.; Bezerra, A.C.; Miranda, W.S.; Muniz, A.W.; Boijink, C.L. 2014. Cultivo de tambaqui em gaiolas de baixo volume: efeito da densidade de estocagem na produção de biomassa. *Ciência Animal Brasileira*, 15(4): 437-443.

IPCC - Intergovernmental Painel Climate Change. 2007. *Climate change 2007: The physical science basis, summary for policymakers.* Geneva: IPCC.

IPCC - Intergovernmental Painel Climate Change. 2013. *Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report Climate Change. The Physical Science – Basis Summary for Policymakers*. Cambridge, Cambridge University Press.

IPCC. Climate change 2014: synthesis report. *Contribution of working groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* The Core Writing Team, Pachauri RK, Meyer L, eds. Geneva: IPCC; 2014.

Jacometo, C.B.; Barrero, N.M.L; Rodriguez-Rodriguez, M.P.; Gomes, P.C.; Povh, J.A.; Junior, D.P.S.; Vargas, L.; Resende, E.K.; Ribeiro, R.P. 2010. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(5): 481-487.

Jégu, M. 2003. Subfamily Serrasalminae (Pacus and piranhas). *In:* Reis, R.E; Kullander, S.O.; Ferraris Jr, C.J. *Check list of the freshwater fishes of South and Central America.* Editora da Pontifícia Universidade Católica, Porto Alegre, Brasil, p. 182-196.

Junk, W.J. 1985. The Amazon floodplain – a sink or source organic carbon. *Mitteilungen aus dem Geologische-Palaontologischen Institut der Universitat Hamburg*. *SCOPE/UNEP Sonderband*, 58, 267-283.

Kaminker, J.S.; Bergman, C.M.; Kronmiller, B.; Carlson, L.; Sviskas, R.; Patel, S.; Frise, E.; Wheeler, D.A.; Lewis, S.E.; Rubin, G.M. et al. 2002. The transposable elements of *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biology,* 3: 12.

Kidwell, M.G.; Lisch, D.R. 2000. Transposable elements and host genome evolution. *Trends in Ecology and Evolution,* 15: 95-99.

Kidwell, M.G. 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica,* 115(1): 49-63.

Kochhann, D.; Jardim, M.M.; Domingos, F.X.V.; Val, A.L. 2015. Biochemical and behavioral responses of the Amazonian fish *Colossoma macropomum* to crude oil: The effect of oil layer on water surface. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 111: 32-41.

Kubitza, F. 2004. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. *Panorama da Aquicultura*, 14: 82.

Laudencia-Chingcuanco, D.; Fower, D.B. 2012. Genotype – dependent burts of transposable element expression in crowns of hexaploid wheat (*Triticum* aestivum L.) during cold acclimation. *Comparative and Functional Genomics.* Doi: 10.1155/2012/2325230.

Li, Y.C.; Korol, A.B; Fahima, T.; Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology,* 237: 155-165.

Lopes, A.; Ferreira, A.B.; Pantoja, P.O.; Parolin, P.; Piedade, M.T.F. 2018. Combined effect of elevated CO_2 level and temperature on germination and initial growth of *Montrichardia arborescens* (L.) Schott (Araceae): a microcosm experiment. *Hydrobiologia*, 814(1): 19-30.

Marengo, J.A. 2007. *Mudanças climáticas globais e seus efeitos sobre a biodiversidade: caracterização do clima atual e definição de alterações climáticas para no território brasileiro ao longo do século XXI.* 2ª Ed. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, Brasília, 212p

Marengo, J.A. 2008. Água e mudanças climáticas. *Estudos avançados*, 22(63).

Marengo, J.A.; Ambrizzi, T.; Da Rocha, R.P.; Alves, L.M.; Cuadra, S.V.; Valverde, M.C.; Ferraz, S.E. 2010. Future change of climate in South America in the late twenty-first century: intercomparison of scenarios from three regional climate models. *Climate Dynamics*, 35(6): 1073-1097.

Marsh, A.G.; Pasqualone, A.A. 2014. DNA methylation and temperature stress in an Antarctic polychaete, Spiophanes tcherniai. *Frontiers in physiology*, 5: 173.

Martínez, J.G.; Machado, V.N.; Caballerro-Gaitán, S.J.; Santos, M.C.F.; Alencar, R.M.; Escobar, L.M.D.; Hrbek, T.; Farias, I.P. 2017. SNPs markers for the heavily overfished

tambaqui *Colossoma macropomum*, a Neotropical fish, using next-generation sequencing-based de novo genotyping. *Conservation Genetics Resources*, 9: 29-33.

Martins, R.T.; de Souza-Rezende, R.; Júnior, J.F.G.; Lopes, A.; Piedade, M.T.F.; de Lima Cavalcante, H.; Hamada, N. 2017. Effects of increasing temperature and, CO2 on quality of litter, shredders, and microorganisms in Amazonian aquatic systems. *PloS one*, 12(11): e0188791.

Mazzuchelli, J.; Martins, C. 2009. Genomic organization of repetitive DNAs in the cichlid fish *Astronotus ocellatus*. *Genetica*, 136: 461-9.

Mendonça, P.P.; Ferreira, R.A.; Vidal Junior, M.V.; Andrade, D.R.; Santos, M.V.B. 2009. Influência do fotoperíodo no desenvolvimento de juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Archivos Zootecnia*, 58(223): 323-331.

Miousse, I.R.; Chalbot, M.C.G.; Lumen, A.; Ferguson, A.; Kavouras, I.G.; Koturbash. I. 2015. Response of transposable elements to environmental stressors. *Mutation Research*, 765: 19–39.

Morey, G.A.; Malta, J.C.O. 2016. Metazoários Parasitas das Narinas do tambaqui *Colossoma Macropomum* (Cuvier, 1818) (Characiformes: Characidae) coletados em Lagos de Várzea da Amazônia Central, Brasil. *Folia Amazonica*, 25(1): 71–76.

Nakayama, C.M.; Feldberg, E.; Bertollo, L.A.C. 2012. Karyotype differentiation and cytotaxonomic considerations in species of Serrasalmidae (Characiformes) from the Amazon basin. *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 53-58.

Nobre, A.C.; Sampaio, G.; Salazar, L. 2007. Mudanças climáticas e Amazônia. *Ciência & Cultura*, 59 (3): 22-27.

Nobre, C.A.; Sampaio, G.; Salazar, L. 2008. *Cenários de mudança climática para a América do Sul para o final do século 21*. Parcerias Estratégicas, Brasília, DF, BR. 24p

de Oliveira, A.M.; Val, A.L. 2017. Effects of climate scenarios on the growth and physiology of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characiformes: Serrasalmidae). *Hydrobiologia*, 789: 167-178.

O'Neill, B.C.; Oppenheimer, M.; Warren, R.; Hallegatte, S.; Kopp, R.E.; Pörtner, H.O.; Mach, K.J. 2017. IPCC reasons for concern regarding climate change risks. *Nature Climate Change*, 7(1): 28.

Pessenda, G.; Piscor, D.; Silva, E.L.D.; Centofante, L.; Parise-Maltempi, P.P. 2018. Chromosomal organization of retrotransposon *Rex1* in *Astyanax* species (Characiformes, Characidae). *Caryologia*, 71(1): 80-84.

Prado-Lima, M.; Val, A.L. 2016. Transcriptomic characterization of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) exposed to three climate change scenarios. *PLoS ONE*, 11(3): e0152366.

Pinkel, D.; Straume, T.; Gray, J.W. 1986. Cytogenetic analysis using quantitative, highsensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the Natural Academy of Science*, 83: 2934-2938.

Prizon, A.C.; Bruschi, D.P.; Gazolla, C.B.; Borin-Carvalho, L.A.; Portela-Castro, A.L.D.B. 2018. Chromosome Spreading of the Retrotransposable Rex-3 Element and Microsatellite Repeats in Karyotypes of the *Ancistrus* Populations. *Zebrafish*, 15(5): 504-514.

Pucci, M.B.; Nogaroto, V.; Moreira-Filho, O.; Vicari, M.R. 2018. Dispersion of transposable elements and multigene families: Microstructural variation in *Characidium* (Characiformes: Crenuchidae) genomes. *Genetics and molecular biology*, 41, 3, 585-592. DOI: http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0121.

Rey, O.; Danchin, E.; Mirouze, M.; Loot, C.; Blanchet, S. 2016. Adaptation to global change: a transposable element–epigenetics perspective. *Trends in ecology & evolution*, 31(7): 514-526.

Ribeiro, L.B. 2013. *Mapeamento físico cromossômico de elementos repetitivos em Colossoma macropomum (Characiformes, Serrasalmidae) associado à piscicultura.* Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 105pp.

Ribeiro, L.B.; Matoso, D.A.; Feldberg, E. 2014. Chromosome mapping of repetitive sequences in four Serrasalmidae species (Characiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 37: 46-53.

Ribeiro, L.B.; Moraes-Neto, A.; Artoni, R.F.; Matoso, D.A.; Feldberg, E. 2017. Chromosomal mapping of repetitive sequences (*Rex3, Rex6,* and rDNA genes) in hybrids between *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Zebrafish,* DOI: 10.1089/zeb.2016.1378.

Santos, F.A.; Marques, D.F.; Terencio, M.L.; Feldberg, E.; Rodrigues, L.R.R. 2016. Cytogenetic variation of repetitive DNA elements in *Hoplias malabaricus* (Characiformes – Erythrinidae) from white, black and clear water rivers of the Amazon Basin. *Genetics and Molecular Biology*, 39(1): 40-48.

Schmidt, T.; Heslop-Harrison, J.S. 1998. Genomes, genes, and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends in Plant Science*, 3: 195-199.

Schneider, C.H; Gross, M.C.; Terencio, M.L.; Carmo, E.J. do; Martins, C.; Feldberg, E. 2013. Evolutionary dynamics of retrotransposable elements *Rex1, Rex3* and *Rex6* in Neotropical cichlid genomes. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 152. doi:10.1186/1471-2148-13-152.

Silva, C.R.; Gomes, L.C.; Brandão, F.R. 2007. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. *Aquaculture*, 264: 135-139.

Silva, D.M.; Pansonato-Alves, J.C.; Utsunomia, R.; Daniel, S.N., Hashimoto, D.T.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2013. Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genética*, 141(7-9): 329-336.

Silva, F.A; Schneider, C.H.; Feldberg, E.; Baccaro, F.B.; Carvalho, N.D.M.; Gross, M.C. 2016. Genomic organization under different environmental conditions: *Hoplosternum Littorale* as a Model. *Zebrafish*, 13(3): 197-208.

Silva, G.S. 2016. *Influência dos contaminantes ambientais Benzo[a]pireno e Roundup® sobre Colossoma macropomum submetida à hipóxia e mudanças climáticas: respostas genéticas, fisiológicas e histológicas.* Tese de doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas. 184pp.

Silva, G.S.; da Fé, L.M.L.; Silva, M.N.P.; Almeida-Val, V.M.F. 2017. *Ras* oncogene and Hypoxia-inducible factor-1 alpha (*hif-1*) expression in the Amazon fish *Colossoma*

macropomum (Cuvier, 1818) exposed to benzo[a]pyrene. *Genetics and Molecular Biology*, 40(2): 491-501.

Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types. In: Sioli H. (eds) *The Amazon. Monographiae Biologicae*, vol 56. Springer, Dordrecht.

Souza, E.B.; Carmo, A.M.C.; Moares, B.C.; Nacif, A.; da Silva Ferreira, D.B.; Rocha, E.J.P.; Souza, P.J.D.O.P. 2016. Seasonal Precipitation Over The Brazilian Legal Amazon: Climate Current And Future Projections Using Regcm4 Model). *Revista Brasileira de Climatologia*, 18.

Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75: 304-306.

Tang, Z.; Zhang, H.H.; Huang, K.; Zhang, X.G.; Han, M.J.; Zhang, Z. 2015. Repeated horizontal transfers of four DNA transposons in invertebrates and bats. *Mobile DNA*, 6(1): 3.

Teixeira, W.G.; Ferreira, I.A.; Cabral-de-Mello, D.C.; Mazzuchelli, J.; Valente, G.T.; Pinhal, D.; Poletto, A.B.; Venere, P.C.; Martins, C. 2009. Organization of repeated DNA elements in the genome of the cichlid fish *Cichla kelberi* and its contributions to the knowledge of fish genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 125: 224-34.

Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 1995. The Amazon ichthyofauna. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds). *Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects.* Springer-Verlang, Berlim, Heidelbeg. p. 29-30

Volff, J.N.; Körting, C.; Sweeney, K.; Schartl, M. 1999. The nonLTR retrotransposon *Rex3* from the fish *Xiphophorus* is widespread among teleosts. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 1427-38.

Volff, J.N.; Körting, C.; Schartl, M. 2000. Multiple lineages of the non-LTR retrotransposon *Rex1* with varying success in invading fish genomes. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1673-84.

Volff, J.N.; Körting, C.; Meyer, A.; Schartl, M. 2001a. Evolution and discontinuous distribution of *Rex3* retrotransposons in fish. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 427-31.

Volff, J.N.; Körting, C.; Froschauer, A.; Sweeney, K.; Schartl, M. 2001b. Non-LTR retrotransposons encoding a restriction enzyme-like endonuclease in vertebrates. *Journal of Molecular Evolution*, 52: 351-60.

Warren, R.; VanDerWal, J.; Price, J.; Welbergen, J.A.; Atkinson, I.; Ramirez-Villegas, J.; Lowe, J. 2013. Quantifying the benefit of early climate change mitigation in avoiding biodiversity loss. *Nature Climate Change*, 3(7): 678.

Wicker, T.; Sabot, F.; Hua-Van, A.; Bennetzen, J.L.; Capy, P.; Chalhoub, B.; Flavell, A.; Leroy, P.; Morgante, M.; Panaud, O.; Paux, E.; SanMiguel, P.; Schulman, A.H. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics* 8: 973.

Wood, C.M.; Netto, J.G.S.; Wilson, J.M.; Duarte, R.M.; Val, A.L. 2017. Nitrogen metabolism in tambaqui (*Colossoma macropomum*), a neotropical model teleost: hypoxia, temperature, exercise, feeding, fasting, and high environmental ammonia. *Journal of Comparative Physiology B*, 187: 135–151.

Yano, C.F.; Poltronieri, J.; Bertollo, L.A.C.; Artoni, R.F.; Liehr, T.; Cioffi, M.B. 2014. Chromosomal mapping of repetitive DNAs in *Triportheus trifurcatus* (Characidae, Characiformes): insights into the differentiation of the Z and W chromosomes. *PLoS One*, 9(3): e90946.